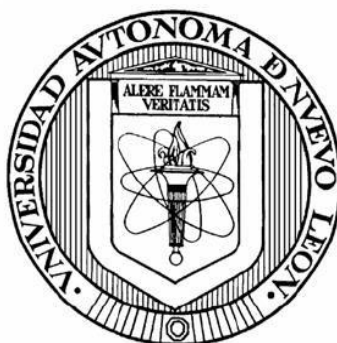


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL POR NUTRIENTES EN LA
FAGOCITOSIS DE LA MICROGLÍA Y DETERIORO COGNITIVO EN RATÓN**

Por

L.B.G. DIANA SOFÍA BERNAL VEGA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Julio, 2021

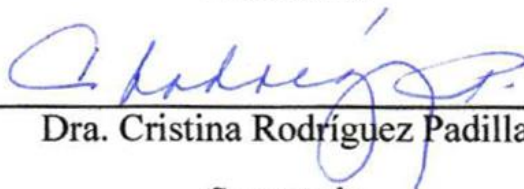
EFFECTO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL POR NUTRIENTES EN LA FAGOCITOSIS DE LA MICROGLÍA Y DETERIORO COGNITIVO EN RATÓN

Comité de Tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez

Presidente



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



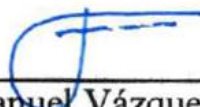
Dra. Claudia Dalila Altamirano Torres

Vocal



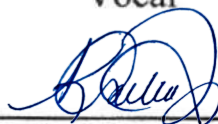
Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Vocal



Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

EFFECTO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL POR NUTRIENTES EN LA FAGOCITOSIS DE LA MICROGLÍA Y DETERIORO COGNITIVO EN RATÓN

Dirección de Tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez

Director Interno



Dr. Alberto Camacho Morales

Director Externo



M. C. Marcela Cárdenas Tueme

Asesor Externo

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CB-2015-255317 y 1006907.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Alberto Camacho Morales por confiar en mí para realizar este proyecto, también por todo su apoyo y disponibilidad para resolver mis dudas a lo largo de este trabajo y seguir alentándome. Gracias por brindarme de nuevo la oportunidad de seguir trabajando con ustedes.

A la Doctora Diana Reséndez Pérez por todo su apoyo e invaluable observaciones.

A Marcela Cárdenas, gracias por siempre estar para mí y guiarme de nuevo durante estos dos años, eres mi inspiración para continuar en este largo y bonito camino de la investigación.

A mi madre y hermanos por siempre ser el motorcito que impulsa mi vida, alentar mis sueños y anhelos y estar para mí siempre que los necesito, los amo.

A Rubén, por escucharme durante mis periodos de frustración, por discutir conmigo sobre este proyecto, por siempre aconsejarme, por todo tu cariño, amor y sobre todo paciencia.

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme las instalaciones para desarrollar este proyecto

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización del proyecto.

DEDICATORIA

Para Daimin, Erika y Pablo.

*Y aquellos que me han acompañado
durante este camino*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Deterioro cognitivo asociado al envejecimiento	3
2.2 Mecanismos celulares y moleculares asociados al deterioro cognitivo	4
2.3. Inflamación crónica asociada al deterioro cognitivo	6
2.4 Neuroinflamación.....	7
2.5 Células microgliales	8
2.6 Mecanismos moleculares asociados a la neuroinflamación.....	11
2.7 La programación fetal de la descendencia favorece la neuroinflamación	11
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
Declaración de ética	18
6.1 Animales de laboratorio	18
6.1.2 Modelo murino de programación fetal por nutrientes hipercalóricos	18
6.2 Pruebas de aprendizaje y memoria.....	20
6.2.1 Alternancia forzada	20
6.2.2 Reconocimiento de objeto nuevo	21
6.2.3 Laberinto de Barnes	21
6.2.4 Alternancia espontánea	22
6.3 Aislamiento de células microgliales.....	23
6.3.1 Sacrificio y disección de hipocampo y corteza de cerebro de ratón	23
6.3.2 Disociación enzimática	24
6.3.3 Preparación de Percoll™.....	24
6.3.4 Obtención de células microgliales por gradiente de densidad con Percoll	25
6.4 Medio condicionado de fibroblastos	25

6.5 Cultivo primario de microglía para ensayo de fagocitosis.....	26
6.6 Cuantificación y marcaje de mielina.....	26
6.7 Ensayo de fagocitosis en la microglía.....	27
6.8 Análisis de la actividad fagocítica mediante citometría de flujo	27
6.9 Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería presenta deterioro de la memoria de trabajo a los 6 meses de edad	28
7.2 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería presenta deterioro de la memoria de reconocimiento a los 6 meses de edad	29
7.3 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería no muestra deterioro de la memoria a corto y largo plazo.....	31
7.4 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería presenta deterioro de la memoria de espacial y de trabajo a los 6 meses de edad	32
7.5 Las células microgliales de la descendencia programada exhiben mayor actividad fagocítica a la mielina	33
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	39
10. PERSPECTIVAS	40
11. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la dieta de cafetería empleada para la programación fetal por nutrientes hipercalóricos.	19
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de los mecanismos moleculares y celulares asociados al deterioro cognitivo.	5
Figura 2. Representación esquemática de la asociación entre la inflamación sistémica crónica y la progresión del deterioro cognitivo.	8
Figura 3. Fenotipo microglial.....	10
Figura 4. Representación gráfica del proceso de programación fetal por nutrientes hipercalóricos.....	13
Figura 5. Estrategia de programación fetal por nutrientes hipercalóricos.	14
Figura 6. Representación esquemática de la programación fetal por nutrientes hipercalóricos.	19
Figura 7. Pruebas de aprendizaje y memoria empleadas para evaluar el estado de cognición de los ratones.	23
Figura 8. Fases obtenidas con el gradiente de Percoll después de la centrifugación.....	25
Figura 9. Efecto de la programación nutricional en la memoria espacial y de trabajo.	29
Figura 10. Análisis del efecto de la programación nutricional en la memoria de reconocimiento.	30
Figura 11. Efecto de la programación nutricional en el aprendizaje espacial y memoria a corto y largo plazo.....	32
Figura 12. Efecto de la programación nutricional en la memoria espacial y de trabajo.	33
Figura 13. Análisis de la actividad fagocítica en la microglía del hipocampo y corteza cerebral.	35

NOMENCLATURA

IL-6	Interleucina 6
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
CRP	Proteína C reactiva
EA	Enfermedad de Alzheimer
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PFC	Corteza prefrontal
TF	Factor transcripcional
DG	Giro dentado
mPFC	Corteza prefrontal medial
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 β
SNC	Sistema nervioso central
BHE	Barrera hematoencefálica
TLR	Receptores tipo Toll
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
IFIT	Proteína inducida por interferón

RESUMEN

El envejecimiento cognitivo es la disminución en el procesamiento y tareas cerebrales que ocurre a medida que las personas envejecen. La presencia de citocinas proinflamatorias circulantes y la activación de células microgliales a nivel central favorecen la progresión del deterioro cognitivo. Se ha propuesto que la exposición a una dieta hipercalórica favorece su presencia a tiempos tempranos a los observados durante el envejecimiento fisiológico. Nuestro grupo de investigación ha contribuido a este tema y demostrado en un modelo murino que la exposición de madres a dieta hipercalórica durante el embarazo y lactancia promueve en su descendencia la activación de células microgliales y aumento del perfil proinflamatorio sistémico y central. En esta tesis identificamos que la programación nutricional con dieta hipercalórica favorece la aparición de deterioro cognitivo a edades tempranas que correlaciona con el aumento en la fagocitosis microglial. La estrategia experimental consistió en exponer ratones hembra C57/BL6J a una dieta hipercalórica (cafetería) durante 9 semanas, y su descendencia de 2 o 6 meses de edad fue evaluada cognitivamente empleando pruebas conductuales para determinar déficits en la capacidad de memoria y aprendizaje. Posteriormente se realizaron cultivos primarios de microglía de hipocampo y corteza cerebral, para caracterizar la fagocitosis se utilizó mielina marcada con BODIPY y se determinó el porcentaje de células fagocíticas mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que la programación nutricional induce el deterioro de la memoria espacial, de reconocimiento y trabajo en la descendencia a los 6 meses de edad, que correlaciona con el aumento en la actividad fagocítica de la microglía del hipocampo y corteza cerebral.

SUMMARY

Cognitive aging is the decline in brain processing and tasks that occurs as people age. It has been proposed that the presence of an inflammatory profile leads to the progression of cognitive impairment through increased levels of circulating proinflammatory cytokines and activation of microglial cells at the central nervous system. Although the molecular pathways that triggers systemic and central inflammation during aging are not clearly defined, it has been proposed that exposure to a hypercaloric diet may favor its presence at earlier times than those observed in physiological aging. For example, our research group has identified in a murine model that exposure of mothers to hypercaloric diet during pregnancy and lactation induces in their offspring activation of microglial cells in the hypothalamus and increased systemic and central proinflammatory profile. In this thesis we identify whether nutritional programming with hypercaloric diet favors the onset of cognitive impairment at early ages through increased microglial phagocytosis. We exposed female C57/BL6J mice to a cafeteria diet for 9 weeks, and their offspring of 2 or 6 months of age were cognitively evaluated using behavioral tests to determine deficits in memory and learning. Next, primary culture of microglia were obtained from hippocampus and cerebral cortex, phagocytosis was determined using myelin stained with BODIPY, the percentage of phagocytic cells was analyzed using flow cytometry. The results obtained show that nutritional programming increases the susceptibility of the offspring to present impaired spatial, recognition and working memory at 6 months through increased phagocytic activity of hippocampal and cerebral cortex microglia.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema biológico de cada organismo de nuestro planeta exhibe deterioro de su funcionamiento a través del tiempo. Desde el punto de vista biológico, el paso del tiempo de vida se manifiesta en el envejecimiento del sistema, el cual integra una serie de cambios estructurales y funcionales, que no son consecuencia de alteraciones patológicas. Aunque todo el sistema biológico envejece, diversos órganos del cuerpo exhiben mayor susceptibilidad a desarrollar y acumular alteraciones estructurales y funcionales selectivas. Para el interés de este proyecto, nos enfocamos en el efecto del envejecimiento en la función del cerebro, en donde se tiene bien identificado que el envejecimiento se acompaña de deterioro cognitivo, el cual se define como la disminución en las funciones cognitivas tales como el aprendizaje, la concentración y la memoria. Desde el punto de vista psicológico, el deterioro cognitivo implica una incapacidad para razonar, comprender e interpretar. La disfunción es multifacética e involucra deterioro de otras funciones ejecutivas que afecta las actividades de la vida diaria (Liu-Seifert et al., 2015). Se conoce desde hace algunos años que el decremento de las funciones cognitivas durante el envejecimiento fisiológico puede verse favorecidos por diversos factores, entre ellos la inflamación crónica. En esta tesis se estudió la relevancia del desarrollo de un estado de inflamación como modulador del deterioro cognitivo.

La inflamación crónica representa una de las características más remarcables del envejecimiento, y se ha relacionado con el desarrollo del deterioro cognitivo. En principio, durante el envejecimiento fisiológico se presenta un estado de inflamación sistémica evidenciado por el aumento de los niveles de Interleucina-6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) y Proteína C reactiva (CRP) en sangre, las cuales conducen a alteraciones en la cognición (Schram et al., 2007; Bettcher et al., 2014; Heringa et al., 2014). El aumento de los niveles de citocinas circulantes puede conducir a una activación aberrante de las células inmunes residentes en el cerebro, llamada microglía. Se ha sugerido que un estado proinflamatorio crónico de bajo grado a nivel periférico junto con inflamación central que incluye la activación de células microgliales, juegan un papel crítico en la progresión del deterioro cognitivo.

Como se ha mencionado anteriormente, se conoce que factores ambientales y de estilo de vida favorecen el envejecimiento y modulan de manera órgano y/o tejido específico las diferencias fenotípicas de cada individuo. Nuestro grupo de investigación y algunos otros en el mundo han identificado que la exposición a dietas con alto contenido calórico que incluyen formulas con alto porcentaje de azúcar y grasa a madres gestantes, son capaces de inducir inflamación crónica de bajo grado en su descendencia (Minihane et al., 2015; Thompson et al., 2018; Keleher et al., 2018), el cuál reproduce una de las características más comunes del envejecimiento fisiológico. A este fenómeno que modula la susceptibilidad del embrión a presentar defectos en su fisiología en la etapa postnatal temprana se le conoce como programación fetal de la descendencia. Específicamente, se propone que durante la programación fetal la exposición a factores ambientales adversos durante etapas críticas del desarrollo genera cambios estructurales y funcionales en las células, los tejidos y los órganos que, independientemente o mediante interacciones con el medio externo, establecen patrones fisiológicos y/o estructurales a largo plazo que pueden «programar» la salud de la descendencia durante su vida temprana y consolidarlo en la adulta (Lindsay et al., 2018).

Datos recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la programación materna por la exposición a nutrientes hipercalóricos promueve un incremento en los niveles de citocina IL-6 en sangre y en el hipotálamo, adicional al incremento en la activación de células microgliales en el hipotálamo y en el núcleo accumbens de la descendencia (Maldonado-Ruiz et al., 2019; Cruz-Carrillo et al., 2020). Estas evidencias apoyan la propuesta que los cambios en el perfil de inflamación sistémica y central pueden observarse en la descendencia a edades tempranas de vida. A la fecha se desconoce si este estado de inflamación crónica modula la actividad fagocítica de la microglía y contribuye a la progresión del deterioro cognitivo durante el envejecimiento. Asimismo, es probable que la programación fetal por exposición a dietas hipercalóricas pueda favorecer la fagocitosis en la microglía y contribuir a la aparición de deterioro cognitivo en etapas tempranas de la vida. Por lo anterior, en este proyecto de tesis se propone identificar el efecto de la programación fetal por exposición a dieta hipercalórica en la fagocitosis microglial y su correlación con la aparición de deterioro cognitivo en etapas tempranas de la vida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Deterioro cognitivo asociado al envejecimiento

Desde el punto de vista biológico, el envejecimiento puede definirse como el paso del tiempo de vida que incluye a una serie de cambios estructurales y funcionales del sistema. De interés, aunque todo el sistema biológico envejece, órganos selectivos del cuerpo muestran mayor o menor susceptibilidad a desarrollar y acumular alteraciones estructurales y funcionales. Para el interés de este proyecto, el envejecimiento cerebral se acompaña de deterioro cognitivo, el cual se define como la disminución en las funciones cognitivas tales como el aprendizaje, la concentración y la memoria. Defectos en la capacidad cognitiva representan uno de los factores principales de riesgo para el desarrollo de trastornos neurodegenerativos. Según el Informe Mundial sobre el Alzheimer (EA), en el año 2018 incluyó a 50 millones de personas con EA y otras demencias, estimándose que este número incrementará a razón de 66 millones para el 2030 y 115 millones para el 2050.

Epidemiológicamente, el deterioro cognitivo es un criterio de selección que define a la enfermedad de Alzheimer (EA) y muchas otras enfermedades neurodegenerativas, y que en gran medida se establece preferentemente en poblaciones de edad avanzada (Bettcher & Kramer, 2014). De esta manera, se propone que el deterioro cognitivo asociado a la edad se caracteriza por el deterioro gradual y progresivo de varios dominios de la capacidad cognitiva, como el déficit en la memoria episódica (o declarativa), aprendizaje espacial, memoria de trabajo, velocidad de procesamiento y atención, que se incluyen en habilidades mentales llamadas "fluidas", de importancia para llevar a cabo las actividades cotidianas, vivir de forma independiente y llevar una vida plena. Si bien la edad es el factor de riesgo más conocido para el deterioro cognitivo, la demencia no es una consecuencia natural o inevitable del envejecimiento. Por ejemplo, en la población humana se ha propuesto que la capacidad de memoria alcanza su punto máximo a los 25 años y luego se deteriora lentamente a un ritmo de aproximadamente 0.5% por año durante el resto de la vida (Morley, 2018). Sin embargo, existe cierta variabilidad entre los individuos en la manifestación de esta disminución (Lindenberger, 2014), ya que depende en gran medida de la interacción con el medio externo y la carga genética de

cada persona (Giogkaraki et al., 2013; Whalley et al., 2016). Además, existen factores de riesgo no modificables para el desarrollo de demencia que incluyen polimorfismos genéticos, edad, género, raza/etnia e historia familiar. De interés para este proyecto, el desarrollo del deterioro cognitivo y la demencia se modula positivamente por factores de riesgo modificables relacionados con el estilo de vida, como la inactividad física, el consumo de tabaco, las dietas poco saludables y el consumo nocivo de alcohol (Gallaway et al., 2017; Peters et al., 2014; Berendsen et al., 2017; Koch et al., 2019). También, ciertas afecciones médicas están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar demencia, que incluyen hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, obesidad y depresión (Muela et al., 2017; Albanese et al., 2017; Halahakoon et al., 2019).

A continuación, se presentan las evidencias científicas actuales que incluyen los procesos biológicos y los mecanismos moleculares que median el deterioro cognitivo durante el envejecimiento fisiológico.

2.2 Mecanismos celulares y moleculares asociados al deterioro cognitivo

Como comentamos anteriormente, el envejecimiento fisiológico es común en todos los sistemas u órganos del cuerpo. De hecho, muchos aspectos celulares y moleculares del envejecimiento cerebral se comparten con otros sistemas corporales. Por ejemplo, durante el envejecimiento fisiológico se ha identificado la presencia de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, homeostasis disfuncional de proteínas (Figura 1), etc., los cuales también son comunes en trastornos neurodegenerativos (Konar et al., 2016). Diversos estudios proporcionan evidencia que apoya el papel del daño oxidativo en la pérdida de las funciones cognitivas asociadas a la edad (Rehman et al., 2017; García-Blanco et al., 2017; Ni et al., 2019). Además, el envejecimiento se acompaña de una acumulación progresiva de daño oxidativo en muchos tejidos, en donde el cerebro es altamente vulnerable a este daño, provocando la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la exacerbación de daño oxidativo no selectivo a los lípidos, ARN, ADN y a las proteínas (Cervellati et al., 2013; Baierle et al., 2015). De manera fisiológica, las especies reactivas de oxígeno se producen principalmente a partir de la mitocondria, las cuales pueden ser susceptibles al estrés oxidativo y favorecer disfunción

mitocondrial si los niveles de producción de ROS incrementan de manera desproporcionada. Se sabe que durante el envejecimiento la mitocondria sufre fragmentación de membrana y su metabolismo disminuye, lo que lleva a una pérdida progresiva de su función, la función mitocondrial deteriorada conduce a la pérdida de neurogénesis y se manifiesta como una disminución de la función cerebral y deterioro cognitivo (Khacho et al., 2019). Sin embargo, debido a su complejidad molecular, estructural y tipo celular único, el cerebro muestra cambios selectivos relacionados con la edad, que incluye la acumulación progresiva de proteínas, mayor número de astrocitos y microglía activos, reducción de la neurogénesis y de sinapsis, cambio en la morfología neuronal, conglomerados neurofibrilares, menor volumen de materia blanca y gris y mayor volumen de líquido cefalorraquídeo (Hullinger & Puglielli 2017).

Adicional a los mecanismos moleculares y celulares anteriormente descritos, se sabe que la presencia de un perfil proinflamatorio sistémico juega un papel importante en el desarrollo del deterioro cognitivo durante el envejecimiento. A continuación, comentaremos las evidencias que justifican la presencia de un estado inflamatorio sistémico y central como un modulador de deterioro cognitivo durante el envejecimiento.

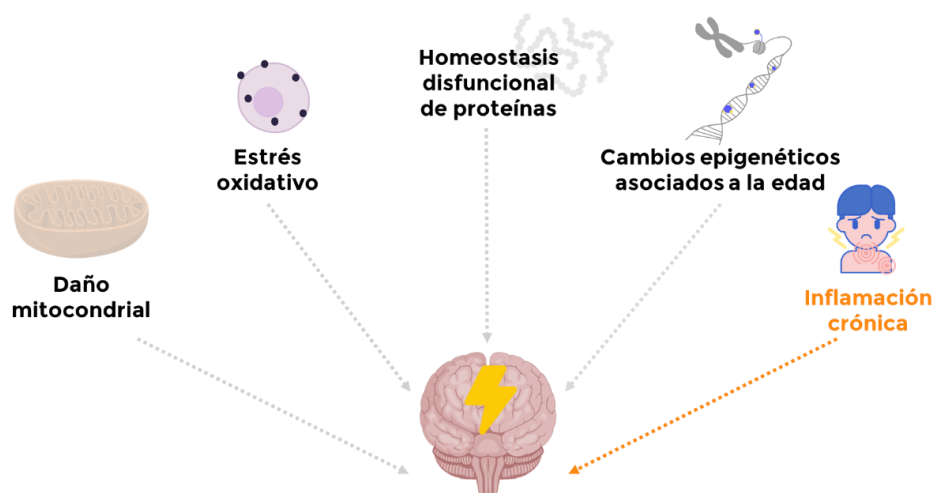


Figura 1. Representación gráfica de los mecanismos moleculares y celulares asociados al deterioro cognitivo. En el diagrama se muestran los mecanismos a nivel molecular y celular que se han relacionado con la aparición/progresión del deterioro cognitivo durante el envejecimiento fisiológico, entre los cuales se encuentra el daño mitocondrial, estrés oxidativo, homeostasis disfuncional de proteínas, cambios epigenéticos y la inflamación crónica.

2.3. Inflamación crónica asociada al deterioro cognitivo

El envejecimiento normal se asocia con una inflamación elevada y prolongada en todo el cuerpo y se ha comprobado que puede modular la función y la cognición cerebral (Sartori et al., 2012). A su vez, el aumento persistente de los niveles de inflamación se asocia con neurodegeneración y alteración de la neurogénesis. Aunque la mayor parte de esta investigación se ha derivado de estudios en modelos animales, estos resultados también podrían emplearse para comprender los mecanismos subyacentes al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento en humanos.

Diversos estudios longitudinales han identificado un estado proinflamatorio crónico de bajo grado durante el envejecimiento (Bektas et al., 2018). La inflamación es la respuesta del sistema inmunitario a estímulos nocivos, que protege al organismo contra los microorganismos invasores, limita el daño tisular y mantiene la homeostasis del cuerpo (Michaud et al., 2013). En condiciones fisiológicas normales, la inflamación se presenta de forma transitoria, destinada a hacer frente y resolver el estímulo negativo que la desencadena, sin embargo, cuando esta se prolonga, ya sea debido a una desregulación intrínseca del sistema inmune, o porque el origen de la reacción inflamatoria no se elimina, la inflamación puede conducir a daño patológico. Este estado de inflamación crónica que se correlaciona con el envejecimiento se ha denominado "*inflamm-aging*", y es un factor de riesgo importante para la aparición, progresión y complicación de muchas enfermedades crónicas, tales como obesidad, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y recientemente se ha asociado con el deterioro cognitivo ((Bektas et al., 2017; Franceschi & Campisi, 2014).

Actualmente, las rutas celulares y los mecanismos moleculares que integran la inflamación asociada al envejecimiento y el deterioro cognitivo siguen siendo muy poco conocidos. La inflamación durante el envejecimiento se caracteriza por el aumento de los niveles sanguíneos de varios biomarcadores inflamatorios, incluidos CRP, Interleucina 6 (IL-6), interleucina 18 (IL-18), interleucina 1 β (IL-1 β) y TNF- α . Estas citocinas instigan la activación del sistema inmune y la exposición prolongada y crónica tiene el potencial de inflammar el tejido de los órganos, incluido el cerebro (Fuchs et al., 2013; Karim et al., 2014, Muller et al., 2017).

2.4 Neuroinflamación

La presencia de marcadores inflamatorios en el cerebro se le ha denominado neuroinflamación. Si bien, los cambios neuroinflamatorios son respuestas transitorias a afecciones agudas que finalmente regresan a un estado de reposo normal, su persistencia y no resolución durante el envejecimiento favorece la progresión del deterioro cognitivo (Bendorius et al., 2018; Konar et al., 2016). De hecho, los procesos neuroinflamatorios en el cerebro participan activamente en la modulación a largo plazo de la función cognitiva y el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Lim et al., 2013).

Aunque aún no está completamente caracterizado, la evidencia reciente indica que los mediadores inflamatorios periféricos modulan de manera directa y eficiente la función cerebral. Por ejemplo, se sabe que las citocinas proinflamatorias circulantes interactúan y regulan al sistema nervioso central (SNC) a través de tres rutas principales: 1) transporte activo e invasión central a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Dantzer et al., 2008; Fung et al., 2012); 2) estimulación de los nervios aferentes y transmisión del estado inflamatorio a las regiones del tronco encefálico inferior, y 3) las citocinas circulantes alcanzan los órganos circunventriculares, activando a tipos celulares que expresan receptores tipo Toll (TLR) y generan una respuesta induciendo mayor producción y liberación de citocinas (Vitkovic et al., 2000; Dantzer et al., 2008; McCusker & Kelley, 2013; Sankowski et al., 2015). De manera integral, se propone que estas vías activarán en el SNC a un blanco y tipo celular común que se encarga de la respuesta inmune innata, la microglía (Dantzer et al., 2008; Sankowski et al., 2015). Este tipo celular se sabe que exacerbará el estado proinflamatorio a nivel central, con una intensidad similar al observado en la periferia (McCusker & Kelley, 2013). Fisiológicamente, la función de la microglía es esencial para mantener la homeostasis del cerebro mediante la vigilancia constante del tejido, así como la de integrar su respuesta a los estímulos estresantes, participando activamente en la neuroinflamación. La neuroinflamación en forma de activación microglial es un componente intrínseco del sistema inmune innato central, sin embargo, su descontrol puede provocar deterioro estructural y funcional en el cerebro y la aparición de déficits cognitivos (Figura 2).

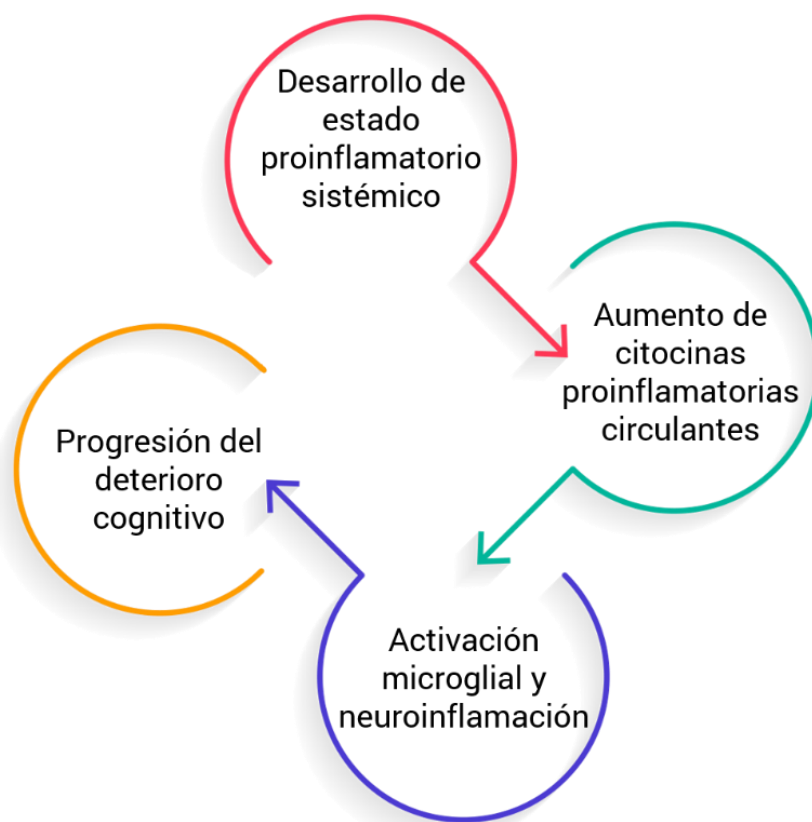


Figura 2. Representación esquemática de la asociación entre la inflamación sistémica crónica y la progresión del deterioro cognitivo. El diagrama indica que el desarrollo de un perfil proinflamatorio sistémico durante el envejecimiento, en el que se da un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias circulantes, estas citocinas pueden interactuar con el sistema nervioso central y activar las células microgliales, de esta forma propagar la inflamación al entorno neuronal. La activación microglial y la neuroinflamación pueden contribuir a la progresión del deterioro cognitivo.

2.5 Células microgliales

La microglía, constituye entre el 10% y el 20% de las células de la glía, son los macrófagos residentes del cerebro y la médula espinal, representan el principal tipo de célula inflamatoria en el SNC y están involucradas en procesos esenciales para el neurodesarrollo, y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis y reparación de lesiones centrales. La microglía tiene su origen a partir de progenitores mesodérmico/mesenquimal en el saco vitelino que migran al SNC de forma temprana durante el desarrollo y se establecen en este como la población residente de macrófagos. (Waisman et al., 2015). En el cerebro adulto, la microglía se encuentra en un estado

inactivo o de reposo, caracterizada morfológicamente por un soma pequeño y numerosas ramificaciones que le permiten la interacción continua del parénquima cerebral (Figura 3). En respuesta a una lesión o patógenos, las células migran y se acumulan en el sitio de la lesión mediante quimiotaxis, sus ramificaciones se retraen y adquiere una estructura ameboide, liberan moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias y adquieren la capacidad de fagocitar. A este estado se le conoce como microglía activa (Prinz & Priller, 2019). La microglía activa se encuentra en casi todos los tipos de enfermedades neurológicas, incluidas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica; enfermedades infecciosas e inflamatorias como la esclerosis múltiple; accidente cerebrovascular; y lesión cerebral traumática (Galloway et al., 2019).

A la fecha, los cambios relacionados a la edad que sufre la microglía no son del todo claros. Se ha descrito que estas células presentan un mayor volumen de soma, retracción de las ramificaciones pérdida en la distribución uniforme en el SNC, además, la velocidad con la que responde a estímulos en su microentorno decae (Figura 3). En conjunto, estos cambios relacionados a la edad se denominan “distrofia microglial” (Koellhoffer et al., 2017). La disfunción microglial asociada a la edad conlleva a la senescencia celular y puede alterar la respuesta a los cambios fisiológicos que ocurren en el cerebro durante el envejecimiento.

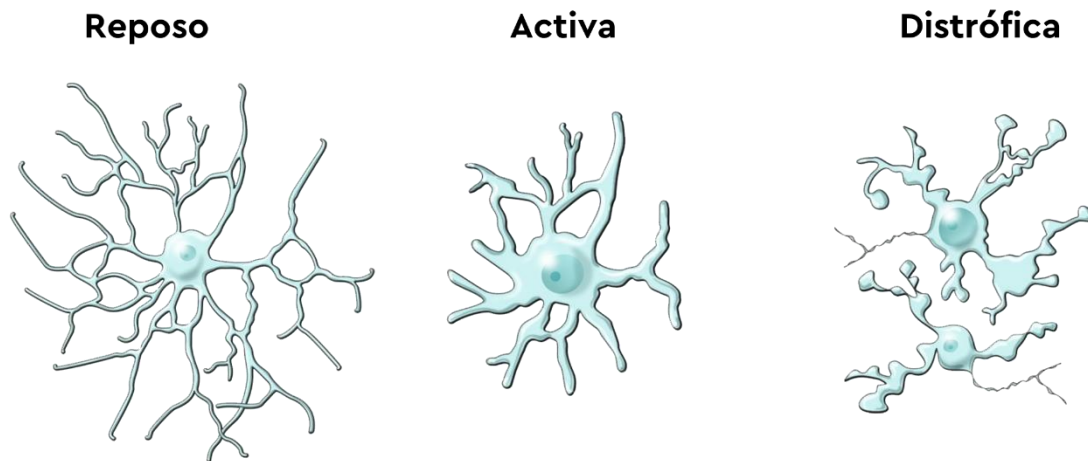


Figura 3. Fenotipo microglial. El diagrama muestra la morfología ramificada característica del fenotipo en reposo de la microglía, la estructura ameboide que adquiere al entrar en un estado activo y la morfología característica de la distrofia microglial. Tomado y modificado de Ransohoff, 2016.

Dentro del SNC, la fagocitosis es un proceso crítico necesario para el desarrollo adecuado del circuito neural y el mantenimiento de la homeostasis. De manera fisiológica, las sinapsis, las células apoptóticas y los desechos a nivel del SNC deben eliminarse continuamente para mantener una función neural óptima. Durante el envejecimiento del SNC, hay una pérdida de sinapsis y degeneración de la mielina que se cree contribuye al deterioro cognitivo relacionado con la edad (Wangs et al., 2020). La evidencia actual sugiere que la eliminación de sinapsis mediada por microglía subyace a la eliminación excesiva de sinapsis durante el envejecimiento normal. Se ha encontrado que con el envejecimiento hay un aumento en la proteína del complemento C1q en todo el cerebro, y en modelos *knockout* de C1q se previene el deterioro cognitivo relacionado con la edad, lo que sugiere que la poda excesiva de sinapsis durante el envejecimiento potencia el deterioro cognitivo (Stephan et al., 2013; Hendrickx et al., 2014; Rupprecht et al., 2021). Además de esto, en modelos murinos de EA la microglía de ratones presenta una menor fagocitosis y degradación de beta amiloide (Njie et al., 2012; Caldeira et al., 2017) y este mismo decremento en la capacidad fagocítica se observa en modelos murinos de Parkinson (Bliederhaeuser et al., 2016).

Uno de los factores que se cree, conlleva a la disfunción fagocítica es el aumento de las señales proinflamatorias en el cerebro. Además de la edad, se han reportado distintos factores y mecanismos moleculares que contribuyen al desarrollo de un estado proinflamatorio, los cuales se mencionan a continuación.

2.6 Mecanismos moleculares asociados a la neuroinflamación

Se han propuesto distintos mecanismos moleculares y factores subyacentes que favorecen un estado de inflamación crónica, entre ellos se encuentran la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, daño al ADN, agotamiento de células madre, desregulación de vías de señalización como NF- κ B y mTOR y patrones moleculares asociados al daño (Xia et al., 2016). Además, diversos estudios han relacionado el consumo de dietas hipercalóricas con la inflamación crónica de bajo grado (Christ et al., 2019). En este contexto, se conoce muy bien que, en condiciones de balance energético positivo u obesidad, se genera un patrón de inflamación crónica caracterizada por la producción anormal de citocinas, el aumento de proteínas de fase aguda y otros mediadores, y la activación de una red de vías de señalización inflamatoria (Pistell et al., 2010). Es de interés que, la ingesta de dietas hipercalóricas durante la etapa de embarazo o lactancia impacta durante el desarrollo fetal del producto y promueve un fenotipo inflamatorio sistémico y central en la descendencia, un fenómeno fisiológico llamado programación fetal (Bilbo & Tsang, 2010), el cual describiremos a continuación.

2.7 La programación fetal de la descendencia favorece la neuroinflamación

El concepto de programación fetal describe el proceso en el que un estímulo ambiental, incluida la exposición a una dieta alta en grasas durante los períodos críticos de desarrollo embrionario, puede programar alteraciones en la organogénesis, el desarrollo de tejidos y el metabolismo, lo que predispone a la descendencia al desarrollo de enfermedades en la etapa adulta. La programación fetal ocurre cuando el ambiente óptimo en el que el feto crece se ve interrumpido por factores externos adversos, especialmente durante los períodos críticos de desarrollo de los órganos esenciales. La

programación fetal, parece ser un mecanismo que permite al nuevo organismo mantener la homeostasis en condiciones hostiles. Posterior al nacimiento, el fenotipo puede volverse permanente y así determinar la aparición de problemas de salud en el futuro. Los efectos adversos a largo plazo reflejan un desajuste entre las condiciones ambientales tempranas (fetales y neonatales) y las condiciones que el individuo enfrentará en su vida postnatal temprana o tardía (Lindsay et al., 2018).

El desarrollo del sistema nervioso es producto de la interacción dinámica y bidireccional entre el genotipo del individuo, adquirido en la concepción y la naturaleza del entorno temprano, que se extiende desde la vida embrionaria y fetal, hasta el nacimiento y la infancia. Eventos o estímulos negativos prenatales y durante la vida temprana del individuo se han asociado con el desarrollo de trastornos neuroconductuales (Figura 4) (Neri & Edlow, 2016; Edlow, 2017). En específico, las alteraciones en la anatomía del cerebro y la conectividad estructural y funcional se han asociado con varios trastornos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos (Bale et al., 2010; Faa et al., 2016). Además, la programación fetal por exposición a nutrientes hipercalóricos induce la presencia de un estado proinflamatorio en su descendencia, muy parecido al mostrado durante el envejecimiento. En este contexto, estudios con roedores y primates no humanos que muestran obesidad materna y/o se exponen al consumo de dietas altas en grasas, se asocia a una mayor expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e IL-1 β en hipotálamo en comparación con la descendencia de madres alimentadas con dieta estándar (Grayson et al., 2010; Pimentel et al., 2012). Además, la descendencia de madres alimentadas con una dieta alta en grasas saturadas o trans exhiben mayor expresión de marcadores de activación microglial, expresión de ARNm de TLR4 e incremento de los niveles de IL-1 β en el hipocampo al nacer en comparación con la descendencia de las madres alimentadas con dieta control (Bilbo & Tsang, 2010).

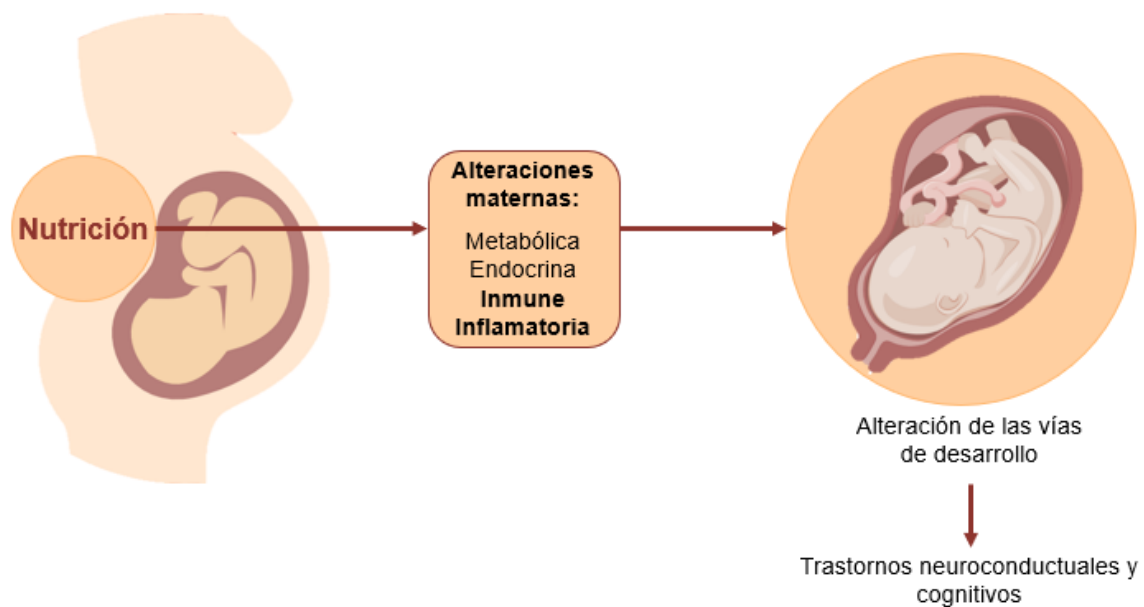


Figura 4. Representación gráfica del proceso de programación fetal por nutrientes hipercalóricos. El diagrama indica que el estado nutricional puede inducir alteraciones biológicas a nivel metabólico, endocrino e inmune, este último puede inducir la aparición de un estado inflamatorio. En conjunto, las alteraciones antes mencionadas alteran las vías de desarrollo del feto, generando una disfunción de órganos y tejidos que se han correlacionado con una mayor susceptibilidad a presentar trastornos neuroconductuales y cognitivos. Tomado y modificado de Lindsay et al., 2018.

2.8 La programación fetal por nutrientes hipercalóricos induce en la descendencia joven características moleculares del envejecimiento fisiológico tardío

Datos experimentales aún no publicados de nuestro laboratorio empleando un modelo murino de programación fetal por exposición materna a nutrientes hipercalóricos (Figura 5) induce el incremento de las citocinas IL-12, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y TNF- α , en la sangre de la descendencia a los dos meses de edad. Este mismo perfil proinflamatorio se observa en ratones viejos de 24 meses de edad. Por otra parte, se ha observado que la descendencia expuesta a programación nutricional exhibe aumento de IL-6 y una disminución de IL-10 en hipotálamo y núcleo accumbens, así como también una mayor activación microglial en esta misma región (Maldonado-Ruiz et al., 2019; Cruz-Carrillo et al., 2020).

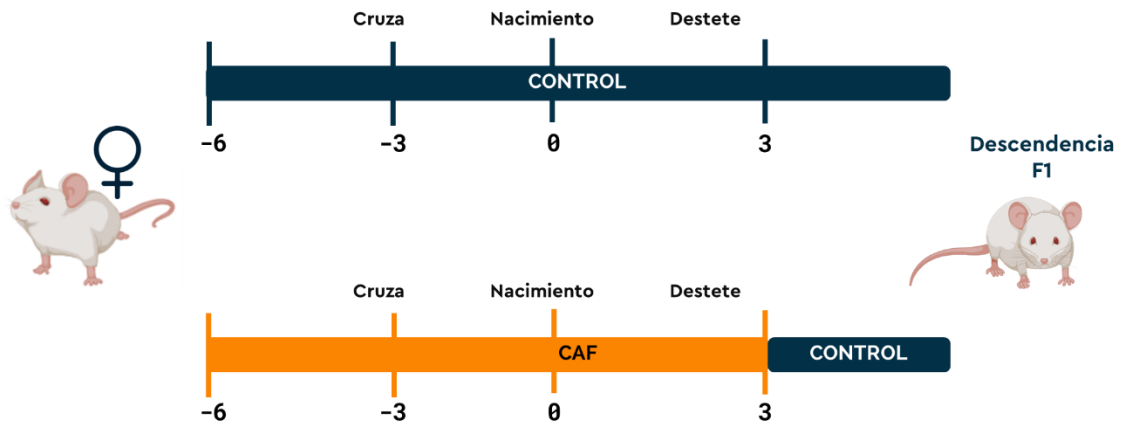


Figura 5. Estrategia de programación fetal por nutrientes hipercalóricos. La programación se realiza exponiendo a ratas hembra a una dieta de cafetería o dieta chow estándar durante nueve semanas. Después del destete, la descendencia de ambos grupos es alimentada exclusivamente con dieta chow. Se observan los grupos de trabajo, grupo 1 hembras con dieta de cafetería por 9 semanas y grupo 2 hembras con dieta control durante las 9 semanas, Las 9 semanas incluyen 3 semanas antes de la cruce, el desarrollo fetal y el destete.

3. JUSTIFICACIÓN

El deterioro cognitivo es una de las características del envejecimiento fisiológico normal que exhibe cambios en la memoria, aprendizaje y velocidad de procesamiento. A nivel molecular, durante el envejecimiento se desarrolla un perfil inflamatorio crónico de bajo grado. Estudios epidemiológicos han relacionado la obesidad materna o exposición fetal a nutrientes hipercalóricos, con trastornos metabólicos, inmunes y conductuales en la descendencia a lo largo de la vida. Se desconoce si la programación fetal afecta las capacidades de memoria y aprendizaje de la descendencia en tiempos tempranos a los observados en el envejecimiento fisiológico, y si esto se encuentra asociado a la activación de la microglía.

Por lo anterior, en esta tesis se estudió el efecto de la programación fetal por nutrientes hipercalóricos en la aparición de deterioro cognitivo en la descendencia a través de la activación microglial a edades tempranas de vida

4. HIPÓTESIS

La programación nutricional materna induce fagocitosis de la microglía y la aparición de deterioro cognitivo en la descendencia en edades tempranas de vida.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Determinar si la programación fetal por nutrientes hipercalóricos favorece la fagocitosis microglial y promueve susceptibilidad a presentar deterioro cognitivo en edades tempranas de vida en un modelo murino.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar el efecto de la programación fetal por nutrientes hipercalóricos en la aparición de deterioro cognitivo en la descendencia de 2 y 6 meses de edad.
2. Analizar la actividad fagocítica de la microglía del hipocampo y corteza cerebral de la descendencia de 2 y 6 meses de edad.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Declaración de ética

Este trabajo incluye el uso de animales de experimentación, por lo que fue sometido para su aprobación por el Comité Interno de Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL con clave de registro CEIBA-2020-012. Todos los procedimientos de trabajo con los animales cumplieron la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

6.1 Animales de laboratorio

Todos los experimentos se realizaron empleando ratones de la cepa C57/BL6J, estos fueron alojados individualmente en jaulas de plexiglás, mantenidos a 20–23 °C en una habitación con temperatura controlada con un ciclo luz/oscuridad de 12 h. El agua y comida estándar estuvo disponible *ad libitum* en la jaula. La disponibilidad de alimento para inducir el protocolo de programación fetal se describe a continuación.

6.1.2 Modelo murino de programación fetal por nutrientes hipercalóricos

Se emplearon 14 hembras vírgenes de la cepa C57/BL6 de 8-10 semanas de edad. Las hembras se dividieron en dos grupos de dieta: dieta estándar (control n=7) y dieta cafetería (CAF, n=7). Las hembras fueron expuestas durante 9 semanas, las cuales incluyen 3 semanas antes de la cruce, 3 semanas durante la cruce y el desarrollo fetal, y 3 semanas después del nacimiento a una dieta estándar (LabDiet, No. Catálogo 5001) en el caso del grupo control y una dieta hipercalórica en el caso del grupo CAF (Figura 6). Posterior al destete, la descendencia de ambos grupos se alimentó exclusivamente con dieta control.

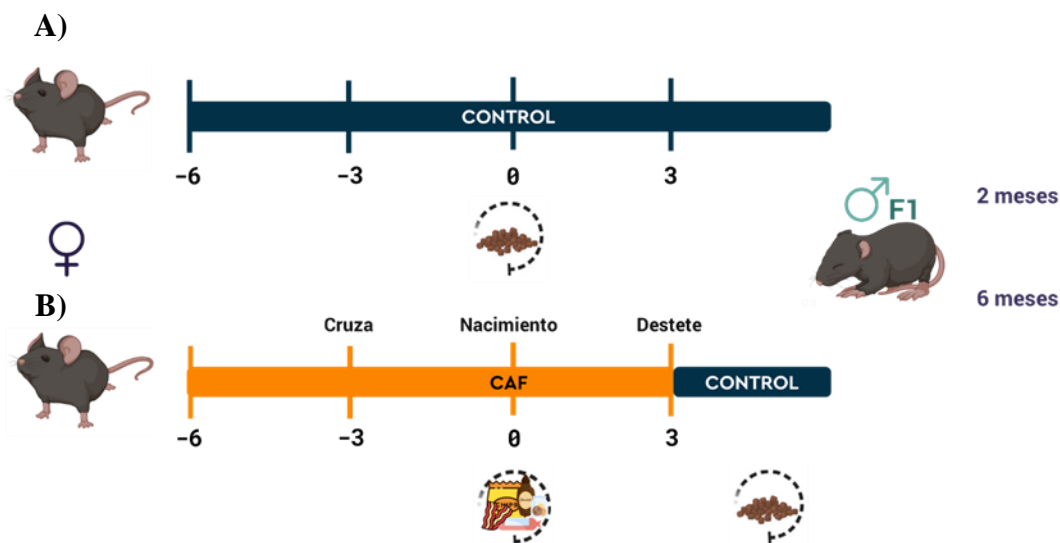


Figura 6. Representación esquemática de la programación fetal por nutrientes hipercalóricos. **A)** Para el grupo experimental 1, las madres fueron expuestas a dieta chow durante 9 semanas., **B)** En el grupo experimental 2 la madre se alimentó con dieta cafetería durante 9 semanas. Las nueve semanas incluyen 3 semanas antes de la cruce, el desarrollo fetal y la lactancia. Después del destete los machos de la F1 fueron alimentados exclusivamente con dieta chow.

La dieta de cafetería se realizó con una mezcla de los componentes que se enlistan en la Tabla 1, que en su conjunto contiene 372 kcal/100 g distribuidas en 39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteínas (Maldonado-Ruiz et al., 2019; Cruz-Carrillo et al., 2020).

Dieta de cafetería	
Galletas Marías®	
Papas fritas Sabritas Original®	
Chocolate líquido Hershey's®	
Tocino Fud®	
Pate de cerdo Zwan®	
Polvo de pellets de comida estándar	

Tabla 1. Componentes de la dieta de cafetería empleada para la programación fetal por nutrientes hipercalóricos.

6.2 Pruebas de aprendizaje y memoria

Para identificar si la descendencia expuesta a programación nutricional presenta deterioro cognitivo los machos de la F1 de 2 y 6 meses de edad se sometieron a distintas pruebas para evaluar la capacidad de memoria y aprendizaje.

6.2.1 Alternancia forzada

La prueba de alternancia forzada analiza la memoria de trabajo. En esta prueba se empleó un laberinto en forma de Y, en el cual se bloqueó uno de los brazos del laberinto y se colocó un ratón en el brazo de inicio y se le permitió explorar dos brazos durante 15 minutos, posteriormente el animal regresó a su jaula 15 minutos y el laberinto se limpió con etanol 70%. A continuación, se colocó al sujeto nuevamente en el laberinto con el brazo desbloqueado y se le permitió explorar durante 5 minutos. En la fase de prueba se determinó si el animal ingresaba al brazo previamente bloqueado y se calculó el porcentaje de alternancia forzada de acuerdo a la siguiente formula: $(100/n) * (\text{Número de animales que realizaron el ingreso correcto})$. Se registró también el tiempo que pasó el sujeto explorando el brazo novedoso (Wolf et al., 2016) (Figura 7A).

6.2.2 Reconocimiento de objeto nuevo

La prueba de reconocimiento de objeto nuevo evalúa la memoria de reconocimiento. Esta consta de dos fases, en la fase de familiarización el animal se colocó en una caja de acrílico transparente con dos objetos idénticos durante 10 minutos para que se habituara al ambiente, después se colocó de nuevo en su jaula y se limpió la caja y los objetos con etanol al 70% para eliminar pistas olfativas. Para la fase de prueba, el ratón se colocó de nuevo en la caja esta vez con un objeto familiar, y otro nuevo y se le permitió explorar la arena durante 10 minutos, el animal se transfirió nuevamente a su jaula y se procedió a limpiar el área. Se cuantificó el tiempo que el ratón pasó explorando los objetos idénticos durante la fase de familiarización y el objeto nuevo en la fase de prueba (Figura 7D). Con esto se calculó el porcentaje de interacción empleando la siguiente fórmula: $(\text{Tiempo de interacción con objeto nuevo} * 100) / (\text{Tiempo de interacción con objeto familiar} + \text{Tiempo de interacción con objeto nuevo})$ (Leger et al., 2013).

6.2.3 Laberinto de Barnes

La prueba del laberinto de Barnes se empleó para evaluar memoria a corto y largo plazo, se realizó en un laberinto constituido por un disco de plástico opaco elevado del suelo, a lo largo del perímetro del disco se distribuyen 20 agujeros de 5 cm de diámetro y debajo de uno de ellos se coloca un cajón de escape de plástico opaco (Figura 7C). El cuarto donde se realiza la prueba se encontraba acondicionado, alumbrado y sin estímulos auditivos, se emplearon pistas visuales alrededor del laberinto. La prueba se realizó en 3 fases, la primera es una fase de entrenamiento que consiste en favorecer la ambientación o familiarización del sujeto a la arena en donde se coloca al animal en el centro del laberinto y se le guía hacia el agujero que conduce al cajón de escape y se le mantiene ahí durante 2 minutos. Posterior a esta prueba se coloca nuevamente al animal en el centro del laberinto y se le permite explorarlo durante 3 minutos hasta que el sujeto encuentra la salida del laberinto. Si el sujeto no encuentra la salida del laberinto, la sesión finaliza y el sujeto es guiado hacia el agujero de salida y mantenido en la cámara durante 1 minuto. Entre cada ronda el laberinto y la caja de escape se limpiaron con etanol 70%. Esto se realizó 4 veces al día, con un intervalo de 15 minutos entre cada

sesión en la cual el animal regresaba a su jaula. En el quinto día se evaluó la memoria a corto plazo, se colocó al animal al centro del laberinto y se le permitió explorar durante 90 segundos. Se cuantificó el número de errores que comete el animal en cada agujero (se considera un error cada vez que el animal asome la cabeza a alguno de los agujeros que no conduce al cajón de escape) y el tiempo de latencia (tiempo que le toma al animal encontrar el agujero correcto) para alcanzar el orificio que conduce al cajón de escape. Esta misma prueba se repitió 7 días después para evaluar la memoria a largo plazo sin ninguna sesión de entrenamiento entre el día 5 a 12 (Sunyer et al., 2007).

6.2.4 Alternancia espontánea

La prueba de alternancia espontánea evalúa la memoria espacial y de trabajo. Se llevó a cabo empleando el laberinto en forma de Y (Figura 7B), consiste en una sola fase de 5 minutos en la cual se les permitió a los ratones explorar libremente los tres brazos del laberinto y se registraron las entradas a cada uno de los brazos, posteriormente el laberinto se limpió con etanol 70%. La alternancia espontánea se definió como entradas consecutivas en 3 brazos diferentes (ABC) y se calculó empleando la siguiente fórmula: $(\text{entradas consecutivas en 3 brazos diferentes}) / (\text{entradas totales} - 2)$ (Wolf et al., 2016).

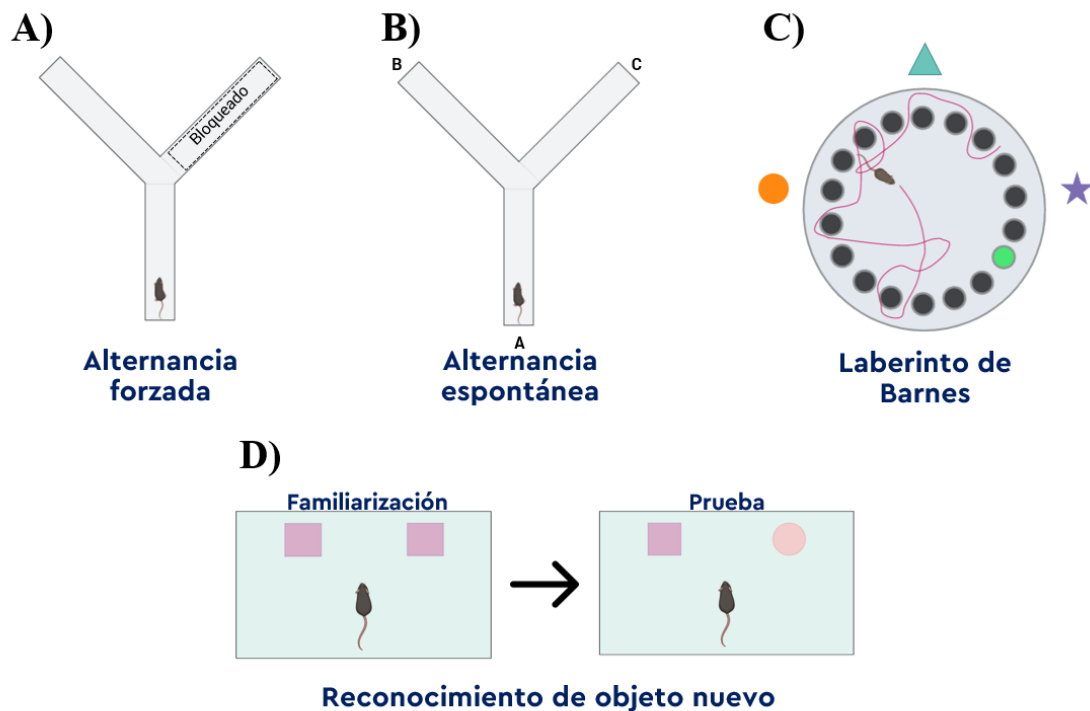


Figura 7. Pruebas de aprendizaje y memoria empleadas para evaluar el estado de cognición de los ratones. **A)** Para evaluar la memoria de trabajo, espacial y a corto plazo de los animales se empleó la prueba de alternancia forzada. **B)** La prueba de alternancia forzada se empleó para evaluar memoria espacial y de trabajo. **C)** El laberinto de Barnes se utilizó para evaluar la memoria a corto y largo plazo. **D)** Mediante la prueba de reconocimiento de objeto nuevo se evaluó la capacidad del ratón para recordar la exposición a determinados objetos.

6.3 Aislamiento de células microgliales

6.3.1 Sacrificio y disección de hipocampo y corteza de cerebro de ratón

Para determinar la actividad fagocítica se realizó un cultivo primario de microglía de las áreas de hipocampo y corteza del cerebro de los ratones. Los ratones se sacrificaron empleando sobredosis de pentobarbital sódico, se retiró la cabeza del ratón y la parte superior del cráneo, se realizó un corte en el centro del cráneo por debajo del gancho post-timpánico izquierdo; y un último corte entre los ojos. Se removió el hueso frontal y parietal y finalmente se obtuvo el cerebro. Posteriormente se removió el bulbo olfatorio, el cerebelo y el mesencéfalo, y se obtuvo la corteza cerebral y el hipocampo. El tejido se homogenizó de forma mecánica con un bisturí en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) de alta glucosa (Sigma, No. Catálogo: D5648) suplementado con

10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina, se transfirió a un tubo cónico de 15 mL y se añadieron 5 mL de medio DMEM completo, posteriormente se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos.

6.3.2 Disociación enzimática

Después de la centrifugación se procedió a decantar el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 mL de PBS con collagenasa D (Roche, No. Catálogo 11088866001) y dispasa II (Sigma, No. Catálogo: D4693) a una concentración de 5 mg/mL, este se incubó durante 20 minutos a 37 °C en agitación a 150 rpm. Después de la incubación enzimática se disgregó el tejido con una pipeta de 1 mL y se añadió un volumen de DMEM completo, la muestra se centrifugó a 1000 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante.

6.3.3 Preparación de Percoll™

Para el aislamiento de la microglía se utilizó Percoll isotónico al 30 y 70%. Se preparó una mezcla de Percoll™ (Sigma, No. Catálogo P1644) con buffer HBSS (Sigma, No. Catálogo H6136) 10x en una proporción 1:10 (HBSS:Percoll), a partir de este se preparó una solución de Percoll al 70% y 40% diluyendo el Percoll isotónico con buffer HBSS sin calcio y magnesio 1x.

6.3.4 Obtención de células microgliales por gradiente de densidad con Percoll

El pellet celular se resuspendió en 6 mL de percoll 70%, y se agregaron 6 mL de Percoll al 40% para formar la capa superior, evitando mezclar las fases y finalmente se añadió 1 mL de HBSS 1x a la fase superior. El gradiente se centrifugó a 1200 x g por 45 minutos sin freno ni aceleración. Se recuperó la mielina y se transfirió a un tubo de 15 mL con un volumen de DMEM completo, después se colectaron 2 mL de la interfase 70 - 40% (Figura 8) y se colocaron en un tubo de 15 mL, se aforó a 15 mL con medio DMEM completo y se centrifugó la suspensión celular a 1200 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µL de DMEM completo.

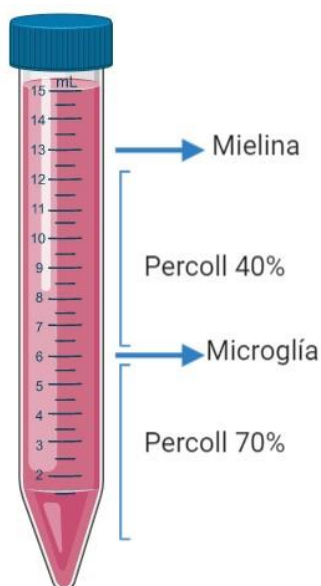


Figura 8. Fases obtenidas con el gradiente de Percoll después de la centrifugación. En la imagen se observan las distintas capas que se forman en el gradiente de densidad con percoll, en la parte superior se encuentra el buffer HBSS seguido de la mielina, el percoll 40%, las células microgliales en la interfase y el percoll 70%.

6.4 Medio condicionado de fibroblastos

Para mantener el cultivo primario de microglía se obtuvo medio condicionado de fibroblastos de la como se describe a continuación.

Las células de fibroblastos murinos NIH/3T3 se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5%, en cajas de cultivo de 75 cm³ con medio DMEM: F-12 (Sigma, No. Catálogo: D8900)

suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Una vez que alcanzaron 80% de confluencia los fibroblastos fueron despegados de las cajas de cultivo y transferidos a una caja de 75 cm³ y cultivados con medio DMEM de alta glucosa completo durante 3 días, posteriormente se recuperó el medio de cultivo, este se filtró usando un filtro de 0.20 µm y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5 Cultivo primario de microglía para ensayo de fagocitosis

La microglía aislada se sembró en placa de 24 pozos con 800 µL de medio DMEM de alta glucosa y 200 µL de medio acondicionado con fibroblastos. La microglía se incubó por 3 días a 37°C en CO₂ al 5%. Transcurrido el tiempo se realizó el cambio de medio usando la misma proporción de DMEM de alta glucosa/medio condicionado y las células se incubaron durante 4 días en las condiciones antes mencionadas.

6.6 Cuantificación y marcaje de mielina

Para el análisis de la actividad fagocítica de la microglía se utilizó mielina obtenida de cerebro de ratón C57BL/6. La mielina se purificó empleando el gradiente de percoll descrito en la sección 6.3.4. Posteriormente, la mielina fue transferida a un tubo cónico de 15 mL y se aforó al volumen máximo con PBS, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y la mielina se resuspendió en 3 mL de PBS con 2 mg/mL de collagenasa D y dispasa II y se incubó durante 30 minutos a 37 °C en agitación a 220 rpm. Posterior a la incubación enzimática la mielina se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y se resuspendió en PBS. Posteriormente, se procedió a realizar la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford. Una vez cuantificada se utilizó BODIPY (Invitrogen, No. Catálogo D3238) a una concentración de 500 pg/mL para el marcaje de lípidos de la mielina, se incubó durante 30 min a 37 °C en oscuridad y después se centrifugó a 1200 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se añadió PBS. Se centrifugó la muestra a 1200 rpm por 10 min y finalmente se resuspendió en 1 mL de DMEM de alta glucosa.

6.7 Ensayo de fagocitosis en la microglía

Posterior a la incubación del cultivo primario de microglía se procedió a realizar el ensayo de fagocitosis. Primero se renovó el medio de cultivo y se añadió la mielina previamente marcada a una concentración de 25 µg/mL. Las células se incubaron en condiciones estándar durante 2 horas, después se descartó el medio, se realizaron 2 lavados con PBS y se agregaron 2 mL de PBS/EDTA/EGTA/Glucosa (1x/ 1mM/ 1mM/ 1mg/mL). Las células se incubaron a 37 °C en agitación constante a 200 rpm durante 2 h para despegarlas.

6.8 Análisis de la actividad fagocítica mediante citometría de flujo

La solución con las células de microglía se transfirió a tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µL de PBS para su análisis en el citómetro de flujo BD Acuri C6 Plus en el canal FL1-A.

6.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se realizó un la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk seguido de un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 y una comparación múltiple de medias de Tukey con ayuda del programa GraphPad Prism 9.0.

7. RESULTADOS

7.1 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería presenta deterioro de la memoria de trabajo a los 6 meses de edad

Inicialmente evaluamos déficits en la memoria espacial y de trabajo en la descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería durante su embarazo y lactancia. Se identificó que la descendencia de 2 meses de edad en el grupo CAF exhibe un 85% de alternancia forzada mientras que el grupo control presenta un porcentaje de alternancia forzada del 80%. Estos cambios no muestran diferencia estadísticamente significativa (Figura 9A). Por su parte, la descendencia de 6 meses de edad porcentaje de alternancia forzada decrece significativamente hasta el 20% en la descendencia del grupo CAF en comparación en el grupo control que conserva el 80% (Figura 9A). No se observan cambios significativos entre el grupo control a la edad de 2 y 6 meses (Figura 9A). En contraste, al tiempo en el brazo previamente bloqueado, no se observa diferencia significativa entre la descendencia de madres expuesta a dieta control Chow y madres expuestas a dieta CAF a la edad de 2 y 6 meses (Figura 9B).

Estos resultados del porcentaje de alternancia forzada demuestran un detrimento de la memoria de trabajo en la descendencia expuesta a programación nutricional a los 6 meses de edad mientras que el tiempo en el brazo previamente bloqueado no presentó efecto.

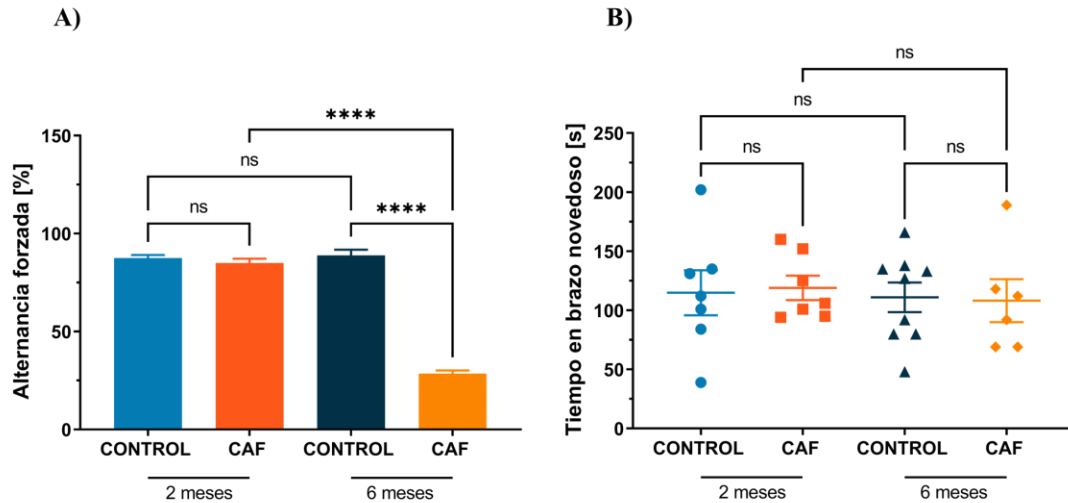


Figura 9. Efecto de la programación nutricional en la memoria de trabajo. La prueba de alternancia forzada se llevó a cabo 15 minutos después de la fase de habituación. **A)** Los ratones del grupo control y el grupo CAF de 2 meses exhiben un porcentaje de alternancia forzada de 80%. El porcentaje de alternancia forzada en el grupo CAF de 6 meses se reduce de forma significativa en un 60% comparado con el grupo control de seis meses y el grupo CAF de 2 meses **B)** En cuanto al tiempo en el brazo novedoso no se encontró una diferencia significativa entre grupos. Los gráficos muestran la media \pm SEM. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. **** p = <0.0001.

7.2 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería presenta deterioro de la memoria de reconocimiento a los 6 meses de edad

Empleamos la prueba de reconocimiento de objeto nuevo para evaluar la memoria de reconocimiento. Identificamos que se observa un 71% de interacción en el grupo CAF de 2 meses de edad, y el grupo control de 2 meses de edad muestra un porcentaje de interacción de 70% sin exhibir diferencia significativa entre ambos grupos de edad (Figura 10). Notablemente, la descendencia de 6 meses de edad de madres expuestas a dieta CAF muestra reducción significativa que alcanza el 42% de la interacción con el objeto nuevo en comparación con el grupo control exhibiendo 78.05% (Figura 10).

Al comparar los grupos control de 2 y 6 meses de edad no se encontró diferencia significativa en el porcentaje de interacción con el objeto nuevo. Por otra parte, la diferencia entre los grupos CAF es estadísticamente significativa (Figura 10). Conforme a estas observaciones se puede concluir que la descendencia programada presenta deterioro de la memoria de reconocimiento a los 6 meses.

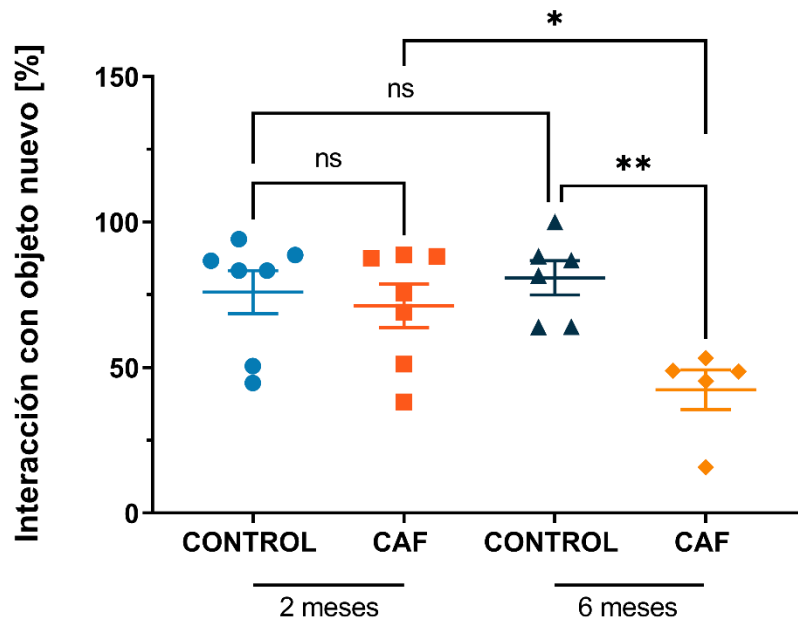


Figura 10. Análisis del efecto de la programación nutricional en la memoria de reconocimiento. En la prueba de reconocimiento de objeto nuevo, el grupo CAF de 2 meses no presenta una diferencia significativa en la interacción comparado con el grupo control. En el caso del grupo CAF el porcentaje de interacción se reduce de forma significativa comparado con el control de 2 meses y CAF 6 meses. Los gráficos muestran la media \pm SEM. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. * $p = 0.0280$ ** $p = <0.0091$.

7.3 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería no muestra deterioro de la memoria a corto y largo plazo

Empleando la prueba de laberinto de Barnes se evaluó la memoria a corto y largo plazo. En esta prueba se analizaron dos variables, el tiempo que le toma al animal encontrar el agujero de salida, indicado como latencia y los errores cometidos. Se realizó en dos fases, la fase de adquisición que comprende los días 1 a 4 y la fase de retención, los días 5 donde se evaluó memoria corto plazo y día 12 donde se evaluó memoria a largo plazo. Los resultados indican que los ratones CAF y control del grupo de 2 meses no presentan diferencia significativa en la fase de adquisición y en la fase de retención. Similarmente, los ratones CAF y control del grupo de 2 meses no presentan diferencia significativa en el número de errores exhibidos durante la prueba conductual. Por otra parte, los ratones del grupo CAF de 6 meses muestran una latencia significativamente mayor tanto en la fase de adquisición y la fase de retención comparados con su grupo control, en el cual la latencia disminuye conforme se desarrolla la curva de aprendizaje (Figura 11A). Respecto al número de errores no se encontró diferencia significativa en ninguna de las fases de entrenamiento en la descendencia de ratones de 2 y 6 meses de edad (Figura 11B).

Al comparar los grupos CAF y control de 2 y 6 meses sólo se observa una diferencia estadísticamente significativa en la latencia, en la fase de adquisición y la fase de retención, siendo mayor la latencia del grupo CAF (Figura 11A). Los grupos control de 2 y 6 meses no presentan una diferencia significativa en la latencia y errores en las dos fases de la prueba.

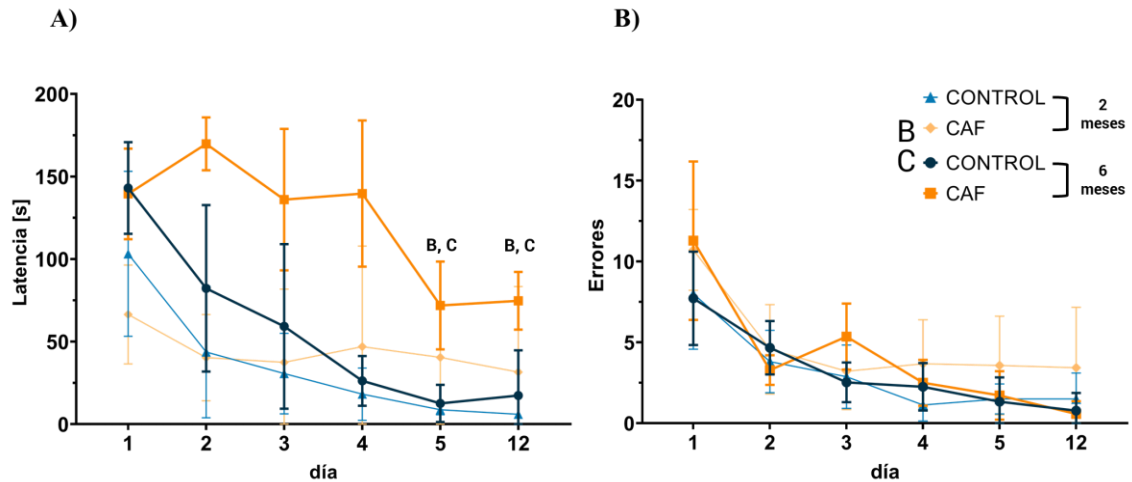


Figura 11. Efecto de la programación nutricional en el aprendizaje espacial y memoria a corto y largo plazo. En la prueba de laberinto de Barnes **A)** La latencia fue estadísticamente mayor en el grupo CAF de 6 meses comparada con el grupo de control de 6 meses y grupo CAF de 2 meses. **B)** La diferencia en el número de errores no fue estadísticamente significativa entre los 4 grupos en ninguna fase. Los gráficos muestran la media \pm SEM. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Tukey. * $p = 0.0280$ ** $p = <0.0091$.

7.4 La descendencia de madres expuestas a dieta de cafetería presenta deterioro de la memoria de espacial y de trabajo a los 6 meses de edad

Se empleó la prueba de alternancia espontánea para evaluar la memoria espacial y de trabajo. En la figura 12 se muestra el porcentaje de alternancia espontánea, se observa que el grupo CAF aumenta a un 68%, sin embargo, la diferencia no es estadísticamente significativa en comparación con el grupo control de 2 meses de edad que presenta un porcentaje de alternancia espontánea alrededor de 61%. A la edad de 6 meses, este porcentaje se reduce significativamente en el grupo CAF a un 45% mientras que los ratones del grupo control presentan un porcentaje de alternancia espontánea de 72%, (Figura 12). Además, al comparar el grupo CAF de 2 meses de edad contra el grupo CAF de 6 meses de edad, se observa reducción estadísticamente significativa de la alternancia espontánea en el grupo CAF de 6 meses. Finalmente, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control (Figura 12).

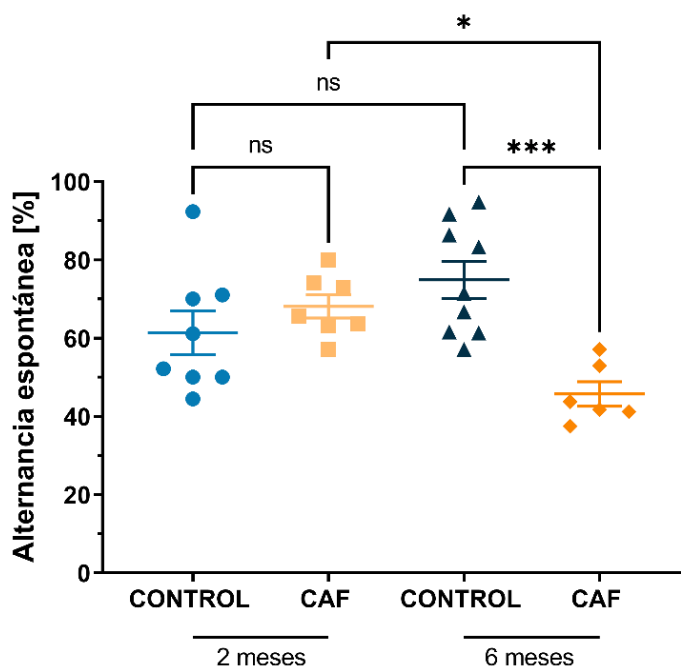


Figura 12. Efecto de la programación nutricional en la memoria espacial y de trabajo. El grupo CAF de 6 meses muestra una alternancia menor que los ratones control de 6 meses y el grupo CAF de 2 meses en la prueba de alternancia espontánea. El gráfico muestra la media \pm SEM. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. * $p = 0.0168$ *** $p = 0.0008$.

Similar a lo obtenido en las pruebas anteriores, sólo la descendencia programada de 6 meses de edad exhibe un decremento en la memoria espacial y de trabajo.

En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición de madres a dieta hipercalórica durante el embarazo y lactancia induce la aparición de déficits cognitivos en la descendencia a los 6 meses de edad.

7.5 Las células microgliales de la descendencia programada exhiben mayor actividad fagocítica a la mielina

Para evaluar el efecto de la programación fetal por nutrientes hipercalóricos en la fagocitosis microglial se realizó un cultivo primario de microglía proveniente del hipocampo y la corteza. La fagocitosis de la microglía se indujo empleando mielina como “carnada” y citometría de flujo se identificó el porcentaje de células positivas para

el marcaje de la mielina (Figura 13A). Los resultados de la figura 13B muestran que en la microglía del grupo CAF el porcentaje de fagocitosis es de 3%, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa en el grupo control de 2 meses de edad que presenta en promedio un porcentaje de 8.7%. Por otra parte, en los sujetos del grupo CAF de 6 meses de edad aumenta el porcentaje de fagocitosis a 32.1%, comparado con el grupo control de 6 meses de edad de forma significativa (Figura 13B). Es importante indicar que el grupo control de 6 meses de edad muestra incremento de fagocitosis a 23.5%, al comparar los grupos control de 2 y 6 meses de edad se observa una diferencia altamente significativa en el porcentaje de fagocitosis.

Estos resultados indican que la programación nutricional induce un aumento en la actividad fagocítica de la microglía del hipocampo y corteza cerebral a los 6 meses de edad. Además, la diferencia encontrada entre los grupos control sugiere que la actividad fagocítica de estas células es un fenómeno dependiente de la edad.

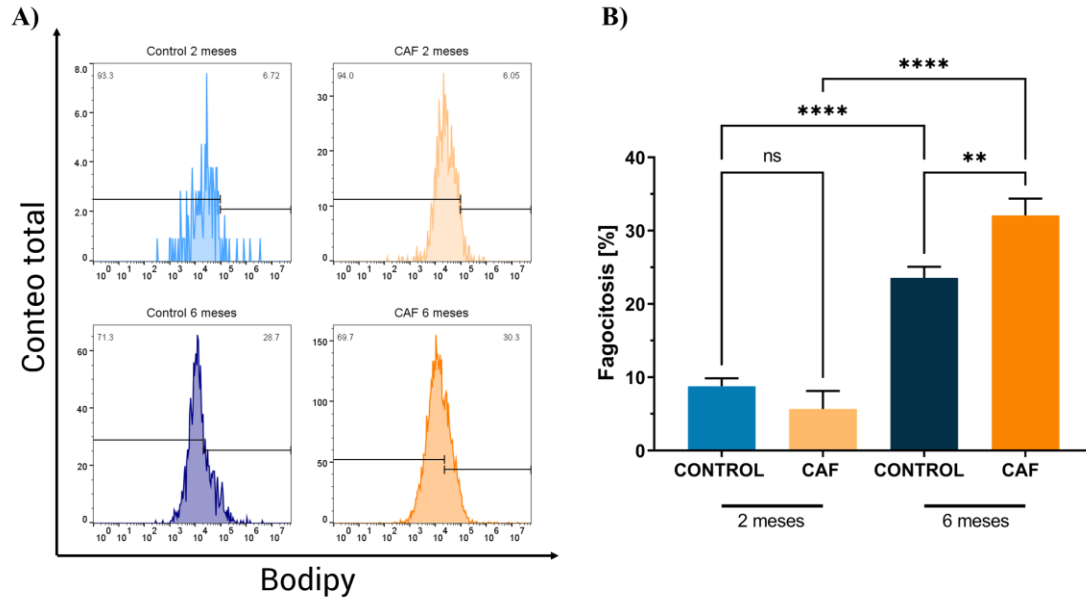


Figura 13. Análisis de la actividad fagocítica en la microglía del hipocampo y corteza cerebral. El análisis se llevó a cabo utilizando mielina marcada con BODIPY y se determinó el porcentaje de células positivas para el marcaje mediante citometría de flujo. **A)** Histograma representativo de la intensidad del marcador BODIPY. **B)** Gráfico de barras del porcentaje de fagocitosis de la mielina marcada. No se obtuvo diferencia significativa entre los grupos de trabajo de 2 meses. El porcentaje de fagocitosis fue significativamente mayor en el grupo CAF de 6 meses comparado con su grupo control y el grupo CAF de 2 meses. El grupo control de 6 meses presentan un aumento significativo en la fagocitosis comparado con el grupo control de 2 meses. El gráfico muestra la media \pm SD. ANOVA de una vía, post hoc Tukey. ** $p = 0.0036$ **** $p = <0.0001$.

8. DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis consistió en determinar si la programación fetal por nutrientes favorece la aparición de deterioro cognitivo en etapas tempranas a través de la fagocitosis microglial. Los datos obtenidos indican que la programación fetal por exposición a dieta hipercalórica favorece la aparición de déficits cognitivos en la descendencia a los 6 meses de edad y que sí se correlaciona con el aumento en la actividad fagocítica de la microglía del hipocampo y de la corteza cerebral.

Se utilizó el modelo de programación fetal por nutrientes descrito por nuestro grupo de trabajo (Maldonado-Ruiz et al., 2019; Cruz-Carrillo et al., 2020). Para ello se emplearon ratones de la cepa C57BL/6, las hembras se dividieron en grupo control y grupo CAF, los grupos fueron alimentados con una dieta control (71% carbohidratos, 11% lípidos y 18% proteína) y dieta CAF (39% carbohidratos, 49% lípidos y 12% proteína) respectivamente. Para evaluar déficits cognitivos los machos de 2 y 6 meses de edad se sometieron a 4 pruebas de memoria y aprendizaje: alternancia forzada y espontánea, reconocimiento de objeto nuevo y laberinto de Barnes, estas pruebas son ampliamente usadas para identificar déficits cognitivos en ratones C57BL/6 (Wolf et al., 2016). Las pruebas de análisis conductual nos permitieron evaluar e identificar criterios de daño cognitivo de memoria y aprendizaje, normalmente asertivos para modelos murinos tales como, memoria de trabajo, memoria de reconocimiento, aprendizaje y memoria espacial y memoria a corto y largo plazo.

Los resultados obtenidos demuestran que los ratones expuestos a dieta con alto contenido de grasa y azúcar presentan deterioro de la memoria espacial, de reconocimiento y de trabajo a los 6 meses de edad. Anteriormente se ha descrito el efecto de la programación nutricional en la memoria y aprendizaje de la descendencia. Por ejemplo, Cordner y colaboradores (2019) a través de un modelo de programación nutricional que consistió en la alimentación de ratas Sprague-Dawley con una dieta hipercalórica (5.21 Kcal/g distribuidas en 20% carbohidratos, 60% lípidos y 20% proteínas) durante la gestación y lactancia encontraron deterioro en la memoria de reconocimiento en la descendencia a los 3 meses. Similar a este resultado, Page y colaboradores (2014) reportan una reducción en la capacidad de aprendizaje espacial en

la descendencia de 3 meses de edad de ratas Sprague-Dawley alimentadas un mes antes de la cruce y hasta el destete de los animales con una dieta compuesta por 4.7 Kcal/g distribuidas en 35% carbohidratos, 45% lípidos y 20% proteínas. También se ha observado que la retención de memoria se encuentra afectada en ratas de 5 meses de madre alimentadas con una dieta alta en grasas (5.21 Kcal/g distribuidas en 20% carbohidratos, 60% lípidos y 20% proteínas) 4 semanas antes de la cruce y hasta el destete de las crías (White et al., 2009). En ratones C57BL/6 el consumo de una dieta con 60% de grasa, 4 semanas antes de la cruce, el desarrollo fetal y la lactancia afecta la memoria de referencia y de trabajo en la descendencia a los 3 meses (Wolfrum et al., 2019; Sarker & Peleg-Raibstein, 2018). Además, también se ha reportado que la obesidad materna afecta la memoria espacial en la descendencia de 1 mes (Tozuka et al., 2010). A pesar del uso de dietas que varían en la composición de los nutrientes y el tiempo de exposición a ellas, estos resultados respaldan el efecto negativo que la exposición a dieta con alto contenido de grasa y azúcar tiene en el aprendizaje y la memoria de la descendencia y sugieren que el fenotipo es dependiente de la edad. Por lo anterior, sería interesante determinar los componentes de la dieta que ejercen un mayor efecto en la disminución de la capacidad cognitiva en la descendencia, así como el período crítico durante el desarrollo prenatal y la lactancia en el que el consumo de dieta hipercalórica induce susceptibilidad a presentar deterioro cognitivo.

Uno de los factores asociados a la progresión del deterioro cognitivo durante el envejecimiento es la inflamación sistémica crónica. Actualmente se sabe que la inflamación sistémica puede causar y/o exacerbar la inflamación en el SNC. En el cerebro, la respuesta inflamatoria está mediada por la activación de la microglía, estas células son altamente sensibles a estímulos que perturban la homeostasis en el SNC y responden a estos adoptando un estado activo que se manifiesta con cambios en la morfología y la regulación positiva de receptores de superficie celular (Nayak et al., 2014) y se ha visto que pueden presentar respuestas diferenciales dependientes de la edad del individuo (Wu et al., 2016). Aunque las alteraciones en la activación de la microglía y liberación de citocinas han sido ampliamente estudiadas, la actividad fagocítica de la microglía durante el envejecimiento y su contribución a diversas patologías del SNC no se comprenden del todo. Para analizar la actividad fagocítica en

el modelo de programación se realizó un cultivo primario de microglía del hipocampo y corteza cerebral y mediante citometría de flujo se determinó la captación de mielina expuesta como “carnada”. Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad fagocítica de la microglía hacia la mielina de la descendencia programada a los 6 meses de edad. Anteriormente se ha reportado que la exposición prenatal a una dieta alta en grasas causa un incremento en la expresión del marcador de actividad fagocítica CD68 en la descendencia y esto se observa a los 4 meses de edad (Contu et al., 2019). De manera inversa, modelos murinos de deterioro cognitivo asociado al envejecimiento muestran decremento de la actividad fagocítica, provocando la acumulación de agregados proteicos, debris de mielina y detritos celulares que se asocia a muerte neuronal y falla en el proceso de remielinización (Shobin et al., 2017; Pluvinaige et al., 2019; Koellhoffer et al., 2017). De manera interesante, empleando modelos de deterioro cognitivo asociado a obesidad se ha demostrado que la microglía exhibe un fenotipo patológicamente reactivo que contribuye a la fagocitosis de sinapsis funcionales en regiones del cerebro asociadas a la cognición, dando como resultado la aparición de deterioro cognitivo a edades tempranas de vida (Hao et al., 2016; Cope et al., 2018). Estos datos experimentales son trascendentales para explicar la función neurobiológica en estados de envejecimiento, en gran parte debido a que la funcionalidad y fenotipo de la microglía parece estar íntimamente asociado a la edad del sujeto. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario y etapas posnatales, la poda sináptica mediada por el sistema de complemento y la participación de la microglía es esencial para el refinamiento de los circuitos neuronales y la función cerebral (Schafer et al., 2012; Stephan et al., 2012; Presumey et al., 2017). Por su parte, la activación de esta vía en etapas adultas puede causar la eliminación excesiva de sinapsis y contribuir a la progresión del deterioro cognitivo durante el envejecimiento (Hong, et al., 2016; Liu et al., 2016; Galloway et al., 2019). Si esto es cierto, hipotetizamos que la programación nutricional materna podría incrementar la actividad fagocítica de la microglía eliminando sinapsis funcionales y contribuyendo al desarrollo de deterioro cognitivo en edades tempranas de la vida.

9. CONCLUSIONES

La programación fetal por nutrientes hipercalóricos induce deterioro de la memoria de reconocimiento, espacial y de trabajo en la descendencia a los 6 meses de edad, que se correlaciona con el aumento de la fagocitosis en la microglía del hipocampo y corteza cerebral.

10. PERSPECTIVAS

1. Analizar si la microglía de la descendencia programada contribuye a la aparición de deterioro cognitivo mediante la eliminación de sinapsis funcionales.
2. Determinar la edad mínima a la que la descendencia programada presenta deterioro cognitivo.
3. Establecer el período crítico durante el desarrollo prenatal en el que el consumo de una dieta alta en grasa y azúcares programa la aparición de deterioro cognitivo.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Albanese, E., Launer, L. J., Egger, M., Prince, M. J., Giannakopoulos, P., Wolters, F. J., & Egan, K. (2017). Body mass index in midlife and dementia: Systematic review and meta-regression analysis of 589,649 men and women followed in longitudinal studies. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 8, 165-178.
- Baierle, M., Nascimento, S. N., Moro, A. M., Brucker, N., Freitas, F., Gauer, B., ... & Duarte, M. M. (2015). Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., McCarthy, M. M., ... & Nestler, E. J. (2010). Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biological psychiatry*, 68(4), 314-319.
- Bektas, A., Schurman, S. H., Sen, R., & Ferrucci, L. (2017). Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *Journal of leukocyte biology*, 102(4), 977-988.
- Bektas, A., Schurman, S. H., Sen, R., & Ferrucci, L. (2018). Aging, inflammation and the environment. *Experimental gerontology*, 105, 10-18.
- Berendsen, A. A., Kang, J. H., van de Rest, O., Feskens, E. J., de Groot, L. C., & Grodstein, F. (2017). The dietary approaches to stop hypertension diet, cognitive function, and cognitive decline in American older women. *Journal of the American Medical Directors Association*, 18(5), 427-432.

Bettcher, B. M., & Kramer, J. H. (2014). Longitudinal inflammation, cognitive decline, and Alzheimer's disease: a mini review. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 96(4), 464-469.

Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *The FASEB Journal*, 24(6), 2104-2115.

Blieberhaeuser, C., Grozdanov, V., Speidel, A., Zondler, L., Ruf, W. P., Bayer, H., ... & Danzer, K. M. (2016). Age-dependent defects of alpha-synuclein oligomer uptake in microglia and monocytes. *Acta neuropathologica*, 131(3), 379-391.

Caldeira, C., Cunha, C., Vaz, A. R., Falcão, A. S., Barateiro, A., Seixas, E., ... & Brites, D. (2017). Key aging-associated alterations in primary microglia response to beta-amyloid stimulation. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 277.

Cervellati, C., Trentini, A., Romani, A., Bellini, T., Bosi, C., Ortolani, B., ... & Zuliani, G. (2015). Serum paraoxonase and arylesterase activities of paraoxonase-1 (PON-1), mild cognitive impairment, and 2-year conversion to dementia: A pilot study. *Journal of neurochemistry*, 135(2), 395-401.

Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794-811.

Contu, L., Nizari, S., Heath, C. J., & Hawkes, C. A. (2019). Pre-and post-natal high fat feeding differentially affects the structure and integrity of the neurovascular unit of 16-month old male and female mice. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1045.

Cope, E. C., LaMarca, E. A., Monari, P. K., Olson, L. B., Martinez, S., Zych, A. D., ... & Gould, E. (2018). Microglia play an active role in obesity-associated cognitive decline. *Journal of Neuroscience*, 38(41), 8889-8904.

Cordner, Z. A., Khambadkone, S. G., Boersma, G. J., Song, L., Summers, T. N., Moran, T. H., & Tamashiro, K. L. (2019). Maternal high-fat diet results in cognitive impairment and hippocampal gene expression changes in rat offspring. *Experimental neurology*, 318, 92-100.

Cruz-Carrillo, G., Montalvo-Martínez, L., Cárdenas-Tueme, M., Bernal-Vega, S., Maldonado-Ruiz, R., Reséndez-Pérez, D., ... & Camacho-Morales, A. (2020). Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats. *Frontiers in Neuroscience*.

Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews neuroscience*, 9(1), 46-56.

Edlow, A. G. (2017). Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. *Prenatal diagnosis* 37(1), 95-110.

Faa, G., Manchia, M., Pintus, R., Gerosa, C., Marcialis, M. A., & Fanos, V. (2016). Fetal programming of neuropsychiatric disorders. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 108(3), 207-223.

Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(Suppl_1), S4-S9.

Fuchs, T., Trollor, J. N., Crawford, J., Brown, D. A., Baune, B. T., Samaras, K., ... & Smith, E. (2013). Macrophage inhibitory cytokine-1 is associated with cognitive impairment and predicts cognitive decline—the Sydney Memory and Aging Study. *Aging cell*, 12(5), 882-889.

Fung, A., Vizcaychipi, M., Lloyd, D., Wan, Y., & Ma, D. (2012). Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain research*, 1446, 144-155.

Gallaway, P., Miyake, H., Buchowski, M., Shimada, M., Yoshitake, Y., Kim, A., & Hongu, N. (2017). Physical activity: a viable way to reduce the risks of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular dementia in older adults. *Brain sciences*, 7(2), 22.

García-Blanco, A., Baquero, M., Vento, M., Gil, E., Bataller, L., & Cháfer-Pericás, C. (2017). Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *Journal of the neurological sciences*, 373, 295-302.

Giogkaraki, E., Michaelides, M. P., & Constantinidou, F. (2013). The role of cognitive reserve in cognitive aging: results from the neurocognitive study on aging. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 35(10), 1024-1035.

Grabert, K., & McColl, B. W. (2018). Isolation and phenotyping of adult mouse microglial cells. In *Macrophages* (pp. 77-86). Humana Press, New York, NY.

Grayson, B. E., Levasseur, P. R., Williams, S. M., Smith, M. S., Marks, D. L., & Grove, K. L. (2010). Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology*, 151(4), 1622-1632.

- Halahakoon, D. C., Lewis, G., & Roiser, J. P. (2019). Cognitive Impairment and Depression—Cause, Consequence, or Coincidence?. *JAMA psychiatry*, 76(3), 239-240.
- Hao, S., Dey, A., Yu, X., & Stranahan, A. M. (2016). Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain, behavior, and immunity*, 51, 230-239.
- Hendrickx, D. A., Van Scheppingen, J., van der Poel, M., Bossers, K., Schuurman, K. G., van Eden, C. G., ... & Huitinga, I. (2017). Gene expression profiling of multiple sclerosis pathology identifies early patterns of demyelination surrounding chronic active lesions. *Frontiers in immunology*, 8, 1810.
- Hong, S., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current opinion in neurobiology*, 36, 128-134.
- Hullinger, R., & Puglielli, L. (2017). Molecular and cellular aspects of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*, 322, 191-205.
- Karim, S., Hopkins, S., Purandare, N., Crowther, J., Morris, J., Tyrrell, P., & Burns, A. (2014). Peripheral inflammatory markers in amnesic mild cognitive impairment. *International journal of geriatric psychiatry*, 29(3), 221-226.
- Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D. S., MacLaurin, J. G., Lagace, D. C., Park, D. S., & Slack, R. S. (2017). Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. *Human molecular genetics*, 26(17), 3327-3341.

Koch, M., Fitzpatrick, A. L., Rapp, S. R., Nahin, R. L., Williamson, J. D., Lopez, O. L., ... & Jensen, M. K. (2019). Alcohol consumption and risk of dementia and cognitive decline among older adults with or without mild cognitive impairment. *JAMA network open*, 2(9), e1910319-e1910319.

Koellhoffer, E. C., McCullough, L. D., & Ritzel, R. M. (2017). Old maids: aging and its impact on microglia function. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 769.

Konar, A., Singh, P., & Thakur, M. K. (2016). Age-associated cognitive decline: insights into molecular switches and recovery avenues. *Aging and disease*, 7(2), 121.

Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature protocols*, 8(12), 2531.

Lim, A., Krajina, K., & Marsland, A. L. (2013). Peripheral inflammation and cognitive aging. In *Inflammation in psychiatry* (Vol. 28, pp. 175-187). Karger Publishers.

Lindenberger, U. (2014). Human cognitive aging: corriger la fortune?. *Science*, 346(6209), 572-578.

Lindsay, K. L., Buss, C., Wadhwa, P. D., & Entringer, S. (2019). The interplay between nutrition and stress in pregnancy: implications for fetal programming of brain development. *Biological psychiatry*, 85(2), 135-149.

Liu, J., Zhao, S. R., & Reyes, T. (2015). Neurological and epigenetic implications of nutritional deficiencies on psychopathology: conceptualization and review of evidence. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 18129-18148.

- McCusker, R. H., & Kelley, K. W. (2013). Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. *Journal of Experimental Biology*, 216(1), 84-98.
- Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., ... & Nourhashemi, F. (2013). Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(12), 877-882.
- Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., ... & McArdle, H. J. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, 114(7), 999-1012.
- Morley, J. E. (2018). An Overview of Cognitive Impairment. *Clinics in geriatric medicine*, 34(4), 505-513.
- Muela, H. C., Costa-Hong, V. A., Yassuda, M. S., Moraes, N. C., Memória, C. M., Machado, M. F., ... & Mansur, A. J. (2017). Hypertension severity is associated with impaired cognitive performance. *Journal of the American Heart Association*, 6(1), e004579.
- Neri, C., & Edlow, A. G. (2016). Effects of maternal obesity on fetal programming: molecular approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6(2), a026591.
- Ni, J., Wu, Z., Stoka, V., Meng, J., Hayashi, Y., Peters, C., ... & Nakanishi, H. (2019). Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induce cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response in mice. *Aging cell*, 18(1), e12856.

- Njie, E, Boelen, E., Stassen, F. R., Steinbusch, H. W., Borchelt, D. R., & Streit, W. J. (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiology of aging*, 33(1), 195-e1.
- Page, K. C., Jones, E. K., & Anday, E. K. (2014). Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(8), R527-R537.
- Peters, R., Poulter, R., Warner, J., Beckett, N., Burch, L., & Bulpitt, C. (2008). Smoking, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review. *BMC geriatrics*, 8(1), 36.
- Pimentel, G. D., Lira, F. S., Rosa, J. C., Oliveira, J. L., Losinskas-Hachul, A. C., Souza, G. I., ... & Seelaender, M. (2012). Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFκBp65 signaling in adult offspring. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(3), 265-271.
- Pistell, P. J., Morrison, C. D., Gupta, S., Knight, A. G., Keller, J. N., Ingram, D. K., & Bruce-Rehman, S. U., Shah, S. A., Ali, T., Chung, J. I., & Kim, M. O. (2017). Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Molecular neurobiology*, 54(1), 255-271.
- Pluvinaige, J. V., Haney, M. S., Smith, B. A., Sun, J., Iram, T., Bonanno, L., ... & Wyss-Coray, T. (2019). CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. *Nature*, 568(7751), 187-192.

- Presumey, J., Bialas, A. R., & Carroll, M. C. (2017). Complement system in neural synapse elimination in development and disease. *Advances in immunology*, 135, 53-79.
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 179(2), 292-311.
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353(6301), 777-783.
- Rupprecht, C., Rupprecht, R., & Rammes, G. (2021). C1q, a small molecule with high impact on brain development: putative role for aging processes and the occurrence of Alzheimer's disease.
- Sankowski, R., Mader, S., & Valdés-Ferrer, S. I. (2015). Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 28.
- Sarker, G., & Peleg-Raibstein, D. (2019). Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. *Nutrients*, 11(1), 7.
- Sartori, A. C., Vance, D. E., Slater, L. Z., & Crowe, M. (2012). The impact of inflammation on cognitive function in older adults: Implications for health care practice and research. *The Journal of Neuroscience Nursing*, 44(4), 206.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., ... & Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691-705.

Shobin, E., Bowley, M. P., Estrada, L. I., Heyworth, N. C., Orczykowski, M. E., Eldridge, S. A., ... & Rosene, D. L. (2017). Microglia activation and phagocytosis: relationship with aging and cognitive impairment in the rhesus monkey. *Geroscience*, 39(2), 199-220.

Stephan, A. H., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annual review of neuroscience*, 35, 369-389.

Stephan, A. H., Madison, D. V., Mateos, J. M., Fraser, D. A., Lovelett, E. A., Coutellier, L., ... & Barres, B. A. (2013). A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. *Journal of Neuroscience*, 33(33), 13460-13474.

Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., & Lubner, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*.

Thompson, J. R., Gustafsson, H. C., DeCapo, M., Takahashi, D. L., Bagley, J. L., Dean, T. A., ... & Sullivan, E. L. (2018). Maternal diet, metabolic state, and inflammatory response exert unique and long-lasting influences on offspring behavior in non-human primates. *Frontiers in endocrinology*, 9, 161.

Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., & Wada, K. (2010). Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochemistry international*, 57(3), 235-247.

Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., & Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Molecular psychiatry*, 5(6), 604-615.

Waisman, A., Ginhoux, F., Greter, M., & Bruttger, J. (2015). Homeostasis of microglia in the adult brain: review of novel microglia depletion systems. *Trends in immunology*, 36(10), 625-636.

Wang, F., Ren, S. Y., Chen, J. F., Liu, K., Li, R. X., Li, Z. F., ... & Mei, F. (2020). Myelin degeneration and diminished myelin renewal contribute to age-related deficits in memory. *Nature neuroscience*, 23(4), 481-486.

Whalley, L. J., Deary, I. J., Appleton, C. L., & Starr, J. M. (2004). Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. *Ageing research reviews*, 3(4), 369-382.

White, C. L., Pistell, P. J., Purpera, M. N., Gupta, S., Fernandez-Kim, S. O., Hise, T. L., ... & Bruce-Keller, A. J. (2009). Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet. *Neurobiology of disease*, 35(1), 3-13.

Wolf, A., Bauer, B., Abner, E. L., Ashkenazy-Frolinger, T., & Hartz, A. (2016). A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 mice. *PloS one*.

Wolfrum, C., & Peleg-Raibstein, D. (2019). Maternal overnutrition leads to cognitive and neurochemical abnormalities in C57BL/6 mice. *Nutritional neuroscience*, 22(10), 688-699.

Wu, Z., Yu, J., Zhu, A., & Nakanishi, H. (2016). Nutrients, microglia aging, and brain aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Xia, S., Zhang, X., Zheng, S., Khanabdali, R., Kalionis, B., Wu, J., ... & Tai, X. (2016).
An update on inflamm-aging: mechanisms, prevention, and treatment. *Journal of immunology research*, 2016.